

CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS TIPO ALFA (RE α) ASOCIADO A LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE NEURONAS SEPTALES HIPOCAMPALES

C. M. Ramírez^{1*}, M. C. González-Montelongo², J. Marrero-Alonso², M. González¹, M. L. Barreiro¹, A. Cabrera-Socorro³, M. Díaz² & R. Marín¹

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina

² Departamento de Biología Animal, Facultad de Biología

³ Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina

Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canarias

* cramirez@ull.es

RESUMEN

Numerosas evidencias de estudios tanto *in vivo* como *in vitro* demuestran el papel de los estrógenos en el desarrollo y la preservación del sistema nervioso central. A pesar de que los mecanismos de acción estrogénicos clásicos o genómicos son bien conocidos, cada vez se describen más acciones estrogénicas alternativas particularmente relevantes en el fenómeno de la neuroprotección. En estos procesos parecen estar implicados receptores de estrógeno de membrana, cuya identidad molecular permanece aún por dilucidar. Con el fin de investigar la estructura molecular de estos receptores de membrana, hemos analizado por western-blot una batería de anticuerpos dirigidos contra diferentes regiones del receptor nuclear tipo alfa, en fracciones de membrana plasmática de dos líneas neuronales de septum (SN56) e hipocampo de ratón (HT22). Además, dado que la glicosilación podría ser una modificación post-traduccional en los receptores de estrógenos (RE), hemos explorado esta posibilidad como posible factor determinante de la existencia de diferentes formas moleculares del receptor de estrógenos en la membrana plasmática. Nuestros resultados demuestran, en ambas líneas celulares, la existencia de una alta homología estructural entre las formas nucleares y de membrana de los RE tipo alfa (RE α), así como la existencia de patrones de O-glicosilación en la isoforma membranaria de 80 KDa.

Palabras Clave: Receptores de estrógenos de membrana, glicosilación, mapeo de epítomos.

ABSTRACT

Evidences from *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated the role of estrogens in the development and preservation of the central nervous system. In addition to the well-known classical or genomic mechanisms of actions of estrogens, evidences accumulated in recent years have substantiated the existence of alternative mechanisms of actions for these hormones, which appear to be particularly relevant in the phenomenon of neuroprotection. Interestingly, these alternative actions are mediated by membrane estrogen receptors whose

molecular identities are not well understood. In order to investigate the molecular features of these membrane located estrogen receptors, we have used several antibodies directed to different regions of the nuclear estrogen receptor (ER) to analyse by western blot the purified plasma membrane proteins of septum-derived SN56 and hippocampal-derived HT22 cell lines. Furthermore, taking into account that glycosylation may be a post-translational modification accounting for the observed different estrogen receptors molecular weights, we have explored here the putative glycosylation of membrane ER isoforms. Our results demonstrate, in both cell lines, the existence of a high degree of structural homology between nuclear and membrane ER counterparts, as well as a clear *O*-glycosylation pattern in the 80 kDa membrane isoform.

Keywords: membrane estrogen receptors, glycosylation, epitope mapping.

1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, se sabe que los estrógenos ejercen sus acciones mediante la unión y activación de los receptores de estrógenos (RE) de los que se conocen dos subtipos (α y β). Estos actúan como factores de transcripción en el núcleo modulando la expresión de ciertos genes (BEATO [2]) que, en el caso concreto de la neuroprotección, pueden estar relacionados con la supervivencia neuronal (PIKE [21]; SINGER *et al.*, [23]; DUBAL *et al.*, [7]). El efecto neuroprotector de los estrógenos se ha demostrado en modelos animales que reproducen paradigmas experimentales de esta enfermedad (revisado en GARCÍA-SEGURA *et al.*, [8]) y en un gran número de cultivos neuronales y líneas neuronales inmortalizadas expuestas a diferentes factores neurotóxicos, tales como la toxicidad inducida por el péptido beta amiloide (β A) (MARIN *et al.*, [11]) considerado como uno de los principales factores neurotóxicos de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, en las dos últimas décadas se ha puesto de manifiesto la existencia de receptores de localización extranuclear, principalmente asociados a la membrana plasmática por mecanismos aún desconocidos teniendo en cuenta su estructura carente de dominios hidrofóbicos, y que podría implicar a otras proteínas asociadas o bien modificaciones post-traduccionales que permitieran su inserción en la membrana plasmática. De manera interesante, estos receptores parecen estar implicados en los mecanismos “no genómicos o alternativos” de los estrógenos, en los que la unión de la hormona produce una señal intracelular rápida (independiente de la transcripción génica) mediante la activación de cascadas de señalización intracelulares (revisado en NADAL *et al.*, [18]).

En la actualidad parece difícil encontrar una zona del cerebro ajena a las acciones de los estrógenos (McEWEN [17]) y, más interesante aún, una parte importante de estas acciones parecen ser ejercidas a través de mecanismos alternativos o rápidos que se iniciarían en la membrana plasmática (WEAVER *et al.*, [26]; SINGER *et al.*, [23]; NORFLEET *et al.*, [19]). Se han descrito lugares de unión a estradiol en la membrana plasmática de muchas regiones del cerebro (ZHENG & RAMIREZ [27]), algunas de las cuales son afectadas en procesos degenerativos (BEYER *et al.*, [3]), así como en cultivos celulares de septum e hipocampo (MARIN *et al.*, [12]; CLARKE *et al.*, [6]). Aunque poco se conoce todavía sobre la identidad molecular de estos receptores de membrana, todo apunta a que pueden ser distintas isoformas de la misma proteína.

En nuestros laboratorios, hemos identificado en los últimos años la existencia de receptores de estrógenos asociados a la membrana en dos líneas neuronales derivadas de

hipocampo (HT22) y de septum (SN56) de ratón. En el caso de esta última, nuestro grupo de investigación ha demostrado por primera vez la participación de un RE de membrana (RE_m) en la neuroprotección ejercida por estradiol frente a una toxicidad inducida por el péptido amiloide (MARIN *et al.*, [12]). Mediante técnicas inmunoquímicas, hemos demostrado la presencia de un RE de tipo alfa con el mismo tamaño que el nuclear (67kDa) en la membrana plasmática de las dos líneas celulares, además de una forma de mayor peso molecular (80kDa), cuya naturaleza está aún por explorar.

Con el fin de caracterizar estas proteínas asociadas a la membrana neuronal, hemos realizado un mapa de epítomos basado en su inmunoreactividad a anticuerpos específicos dirigidos contra diferentes regiones de la estructura del RE α nuclear clásico, obteniendo una valiosa información acerca del grado de homología existente entre las formas de membrana con respecto al receptor nuclear clásico. Por último, dado que ha sido previamente demostrada la existencia de subpoblaciones celulares del RE nuclear clásico con modificaciones post-traduccionales por glicosilación de la proteína nativa (CHEN & HART [5]), lo que parece estar relacionado con la modulación funcional de la misma, hemos explorado esta posibilidad para el caso de los receptores de membrana presentes en ambos modelos celulares (SN56 y HT22).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares SN56 y HT22 se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con Suero Bovino Fetal al 10 %, 4,5 g/l de Glucosa, 3,7 g/l de NaHCO₃, 61 mg/l de Penicilina G y 100 mg/l de Sulfato de Estreptomina (pH= 7.4), a una temperatura de 37 °C en una atmósfera que contenía 5 % CO₂-95% aire. Cuando se alcanzan niveles de confluencia del 70-80%, las células se disociaron con tripsina (0.25 %) y se sembraron en placas Petri de 35 × 10 mm o 60 × 15 mm para los diferentes experimentos.

2.2 Extracción de proteínas de la membrana plasmática a partir de las líneas neuronales

Las membranas plasmáticas de las líneas celulares fueron aisladas usando la técnica de la sílice coloidal catiónica (CHANEY & JACOBSON [4]), la cual permite la obtención de fracciones purificadas con un 80-90% de proteínas de este dominio celular. El grado de pureza de las fracciones de membrana se estableció mediante técnicas de western blot, utilizando por una parte un anticuerpo específico dirigido contra la proteína Hsp90 (citósolica), y por otra parte un anticuerpo contra la subunidad $\alpha 1$ de la Na⁺/K⁺-ATPasa (localizada exclusivamente en la membrana plasmática) (MARIN *et al.*, [14]).

2.3 Western blot

Los extractos proteicos (totales y de membrana plasmática) obtenidos a partir de las líneas celulares SN56 y HT22 se resolvieron en geles de poliacrilamida al 10 %, y se transfirieron electroforéticamente a membranas de polivinilo (PVDF). Estas membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario contra el RE α (Ver tabla 1) diluido en BLOTTO (*Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer*), es decir, una solución de leche en polvo desnatada disuelta en PBS (*Phosphate Buffered Saline*) al 5%. Posteriormente se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo secundario acoplado a

Anticuerpo anti-RE α	Dominio	Proveedor Comercial	Dilución utilizada
ER21	Amino-terminal	Cedido por el Dr. Geoffrey L. Green Universidad de Chicago, Estados Unidos	3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
H184	(A/B) Unión ADN	Sta. Cruz Biotechnology	1:200
H151	(D) Bisagra	Stressgen	1:150
Ab10	(E) Unión hormona	Neomarkers	5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
MC 20	C-terminal	Sta. Cruz Biotechnology	1:200

Tabla 1. Información de interés sobre los anticuerpos anti-RE α utilizados.

Peroxidasa de Rábano (*HRP*). Las bandas inmunoreactivas se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema comercial “ECL plus” de Amersham. Los extractos totales de la línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7), se utilizaron en algunos casos como control positivo de los western blot con anticuerpos contra el RE α .

2.4 Ensayos de inmunoprecipitación

Los extractos proteicos procedentes de las dos líneas neuronales SN56 y HT22 se incubaron con agitación durante 1 hora a 4°C con un exceso del anticuerpo dirigido contra el RE. A continuación, los inmunocomplejos fueron adsorbidos por esferas magnéticas (Dynabeads®). Las proteínas inmunoprecipitadas fueron extraídas del complejo formado por elución en el tampón de carga de electroforesis en condiciones desnaturalizantes o SDS-PAGE (625 mM Tris-HCl, 1% duodecil sulfato de sodio, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol, pH 6.8), calentando a 99°C durante 5 minutos. Las proteínas inmunoprecipitadas se procesaron y analizaron posteriormente por western-blot.

2.5 Detección de glicoproteínas y deglicosilación

Para la detección de proteínas glicosiladas en las dos líneas celulares se utilizó el sistema comercial “Glycoprotein Detection Kit” de Amersham. Los extractos proteicos totales y de membrana plasmática se resolvieron y transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF. Las proteínas inmovilizadas en membranas de PVDF se trataron con 10 mM de metaperiodato sódico, un compuesto que oxida específicamente los grupos glicosídicos de las proteínas, convirtiéndolos en residuos de aldehído. Los grupos aldehídos generados de esta manera son altamente reactivos a la hidracina que se encuentra unida a la biotina. El tratamiento posterior con estreptavidina acoplada a la peroxidasa de rábano (*HRP*) permitió revelar la presencia de glicoproteínas por quimioluminiscencia, usando el sistema comercial “ECL plus”. Para los ensayos de deglicosilación se utilizó un sistema comercial, procediendo según las instrucciones del fabricante (E-Degly, Sigma).

3. RESULTADOS

Mediante técnicas de western blot sobre fracciones purificadas de membrana plasmática de las líneas celulares SN56 y HT22 hemos revelado la presencia de proteínas inmuno-reactivas a una serie de anticuerpos dirigidos contra las diferentes regiones del RE α clásico, cuyas características se describen en la Tabla 1. Los resultados muestran que todos los anticuerpos, excepto el H184 dirigido contra la región amino-terminal, reconocen una proteína de 67kDa en las fracciones de membrana (MP), del mismo tamaño que el receptor alfa clásico nuclear presente en los extractos totales (Total) de ambas líneas celulares (Fig 1A). Sin embargo, el H184 es capaz de reconocer la isoforma de 67kDa en fracciones de membrana plasmática mediante ensayos de inmunoprecipitación con este mismo anticuerpo o con el Ab10 (Fig 2). Además, hemos observado tanto en extractos totales como en fracciones purificadas de la membrana plasmática de ambas líneas celulares, la presencia de una proteína de mayor peso molecular (80kDa), que es reconocida por todos los anticuerpos utilizados excepto por el ER21 y el H151 (Fig 1A). En conjunto, estos datos sugieren la existencia de, al menos, dos proteínas parecidas al RE α nuclear en la membrana plasmática de las dos líneas neuronales SN56 y HT22.

La existencia de una forma del RE α de mayor tamaño (80kDa) en las dos líneas celulares nos llevó a considerar la posibilidad de que ésta pudiera ser una forma glicosilada de la proteína de 67kDa, que le pudiera conferir un patrón electroforético diferente, tal y como



Figura 1. A) Análisis por Western Blot de la expresión del RE α en fracciones purificadas de membrana plasmática (MP) de las líneas celulares SN56 y HT22. Los extractos totales (Total) se tomaron como control. (*) Ausencia de reconocimiento de la banda de 67 kDa por el H184.

Ensayos de inmunoprecipitación de RE α en fracciones de membrana de las células SN56

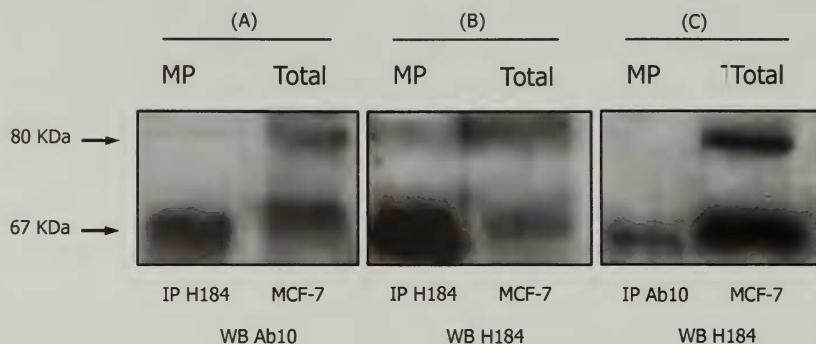
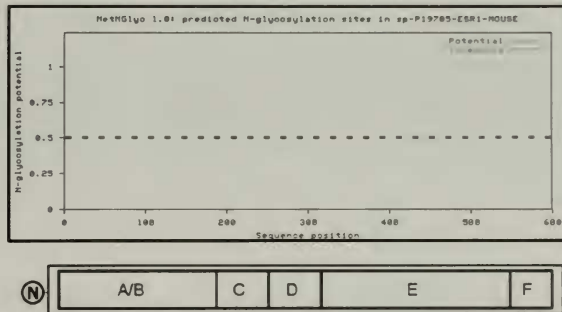


Figura 2. Ensayos de inmunoprecipitación en fracciones de membrana (MP) de SN56. (A) y (B): En condiciones no desnaturalizantes (nativas) el anticuerpo H184 inmunoprecipitó la banda de 67kDa en membrana (IP H184), y fue reconocida por western blot con este mismo anticuerpo (WB H184) y el Ab10 (WB Ab10). (C): Cuando se inmunoprecipitó la forma de 67kDa en membrana con otro anticuerpo (IP Ab10), el H184 fue capaz de reconocerla también por western blot (WB H184). Como control de los western blots se usaron extractos totales de la línea celular MCF-7.

se ha descrito para el receptor de andrógenos (McCANN *et al.*, [16]). El análisis de los posibles sitios de glicosilación del RE α de ratón se examinó utilizando una herramienta bioinformática disponible en las bases de datos internacionales, introduciendo en la misma la secuencia de aminoácidos del RE α (JULENIUS *et al.*, [9]). Los resultados muestran que en esta proteína no hay ningún sitio probable de *N*-glicosilación (Fig 3A), pero sí diversos sitios con una probabilidad media de ser susceptibles a *O*-glicosilación (Fig 3B). Sin embargo, posteriores ensayos de deglicosilación con enzimas *O*-/*N*-deglicosilasas no produjeron variaciones en la movilidad electroforética de esta proteína (MARIN *et al.*, [14]), indicando que el incremento en el peso molecular no parece ser debido a la presencia de un gran número de grupos glicosídicos. No obstante, los ensayos de detección de proteínas glicosiladas realizados en extractos totales y en fracciones de membrana de SN56 y HT22 revelaron la presencia de glicoproteínas del mismo peso molecular que la forma de 80kDa (Fig 4A). En ausencia del agente oxidante que proporciona el sistema comercial utilizado para detectar proteínas glicosiladas (ver material y métodos), no se apreció marcaje alguno ni siquiera para la transferrina, usada como control positivo por ser una proteína glicosilada. Para demostrar que el marcaje obtenido a 80kDa se debía específicamente a la presencia de proteínas glicosiladas, realizamos un tratamiento previo con enzimas deglicosilasas. Los ensayos de deglicosilación con *O*-deglicosilasas eliminaron el marcaje a 80kDa obtenido con el sistema de detección de glicoproteínas, permaneciendo exclusivamente en el extracto que no fue deglicosilado (Fig 4B). Estos resultados indican que aunque la glicosilación no parece explicar este aumento del tamaño molecular, la proteína de 80kDa presente en los extractos totales y de membrana plasmática de las líneas celulares SN56 y HT22 sea probablemente una forma *O*-glicosilada del RE α .

Predicción de sitios de glicosilación del RE α de ratón

(A) N-glicosilación



(B) O-glicosilación

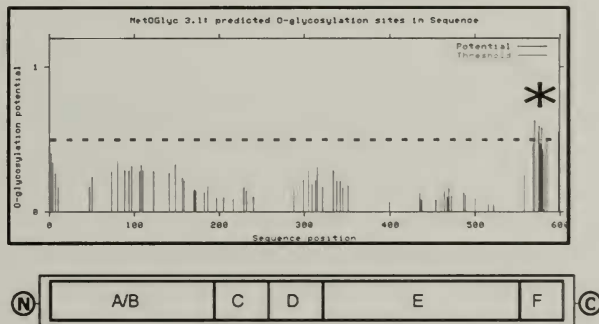


Figura 3. Predicción de sitios de *N*/*O*-glicosilación del RE α de ratón. Debajo de cada panel se muestra la estructura esquemática del RE. Las líneas azules representan residuos aminoacídicos que son susceptibles de glicosilación. A) El RE α de ratón no muestra probabilidad alguna de sufrir *N*-glicosilación en ningún aminoácido de su estructura proteica. B) En este caso se observan diversos sitios potenciales de sufrir *O*-glicosilación a lo largo de la estructura del receptor. (*) Nótese la existencia de un grupo de residuos aminoacídicos en la zona cercana a la región carboxi-terminal del receptor, con una probabilidad superior a la media (línea de puntos) de sufrir *O*-glicosilación.

4. DISCUSIÓN

Un aspecto clave de las funciones de los estrógenos en el cerebro parece ser su potencial relevancia en la preservación y supervivencia neuronal, acciones en las que los mecanismos no genómicos o alternativos están cobrando un protagonismo creciente. A pesar de que se describen cada vez más ejemplos de fenómenos de neuroprotección mediados por estos mecanismos no genómicos o alternativos, se conoce muy poco sobre la identidad molecular de los receptores de estrógenos no convencionales que están implicados en los mismos (MARIN *et al.*, [13]).

Detección de glicoproteínas en fracciones de membrana de SN56 y HT22

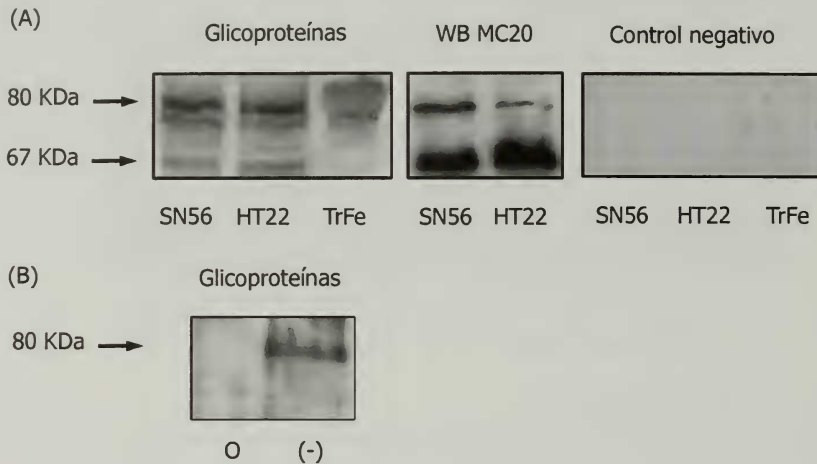


Figura 4. Detección de glicoproteínas en fracciones de membrana de SN56 y HT22. (A): El sistema de detección de glicoproteínas reveló la presencia de grupos glicosídicos de 80kDa, del mismo peso molecular que la proteína reconocida por western blot con el anticuerpo MC20 (WB MC20). Como control positivo se utilizó la transferrina (TrFe), que es una proteína glicosilada. El mismo procedimiento en ausencia de los agentes oxidantes que proporciona el sistema no mostró presencia alguna de glicoproteínas, ni siquiera para la transferrina. (B): Como control de la eficiencia del sistema de detección de glicoproteínas realizamos previamente un tratamiento con enzimas deglicosilantes. El tratamiento de las fracciones de membrana con enzimas *O*-deglicosilasas (O) eliminó el marcaje de glicoproteínas. El marcaje a 80kDa permaneció sólo en los extractos que no fueron deglicosilados (-).

En nuestro laboratorio, se ha demostrado por primera vez la existencia de un RE α de membrana en las células SN56 que participa a través de un mecanismo de acción alternativo en la neuroprotección frente a la toxicidad del péptido β -amiloide (toxicidad tipo Alzheimer) (MARIN *et al.*, [12]). Basándonos en técnicas inmunoquímicas (western-blot e inmunoprecipitación), hemos abordado un estudio comparativo sobre la estructura molecular de los receptores de estrógenos presentes en la membrana plasmática de las líneas neuronales SN56 y HT22, en relación a su homología con el RE α nuclear clásico (MARIN *et al.*, [14]). Para ello, utilizamos una batería de anticuerpos dirigidos contra diferentes regiones de este receptor clásico que fueron expuestos a extractos proteicos de fracciones purificadas de membrana plasmática de las dos líneas celulares mediante ensayos de western-blot. Los resultados demostraron que las bandas electroforéticas eran reconocidas por la mayoría de estos anticuerpos, indicando que las formas extranucleares (o de membrana) comparten la mayoría de los dominios estructurales del RE nuclear clásico. Estos resultados están en concordancia con datos previos en los que se demostró que una parte importante de los receptores de estrógenos identificados a nivel de la membrana plasmática (REm) de neuronas presentaban homologías con los REs clásicos (NORFLEET *et al.*, [19]; PAPPAS *et al.*, [20]; WATSON *et al.*, 2002 [25]). Aunque con algunas excepciones, la hipótesis más generalizada supone que el REm y el RE nuclear podrían originarse a partir de un transcrito común (LEVIN [10]; WATSON & GAMETCHU [24]).

Asimismo, la existencia de proteínas de mayor peso molecular (>67kDa) ha sido descrita también en varios tejidos de origen neuronal, como en corteza cerebral de ratón (112kDa) (ASAITHAMBI *et al.*, [1]), en septum e hipocampo de ratón (97kDa) (MARIN *et al.*, [14]), e incluso en humanos (80kDa). Una explicación razonable al incremento en el peso molecular de estos receptores sería que fueran el resultado de algún tipo de modificación post-traducciona del tipo glicosilación, tal y como sucede en el caso del receptor de andrógenos (McCANN *et al.*, [16]). Sin embargo, estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que estas proteínas no sufren cambios en la movilidad electroforética tras el tratamiento con enzimas deglicosilasas y que por lo tanto, la diferencia en el peso molecular no puede deberse a la adición de un número considerable de grupos glicosídicos. Otra posibilidad es que estas proteínas sean el resultados de un procesamiento o “*splicing*” alternativo del ARN, tal y como se ha descrito en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, en la que se expresa una forma de 80kDa como resultado de la duplicación de los exones 6 y 7 (PINK *et al.*, [22]). Esta hipótesis está siendo actualmente explorada en las líneas celulares SN56 y HT22.

Las modificaciones post-traduccionales regulan importantes aspectos de la biología del RE, ya que esta molécula carece de dominios hidrofóbicos que le permitan su inserción a la membrana plasmática (MARINO *et al.*, [15]). Algunas, como la palmitoilación (adición de ácido palmítico) podría explicar la presencia de RE en la membrana plasmática. Otras modificaciones parecen estar más relacionadas con la regulación molecular del RE. A pesar de que en nuestros modelos experimentales la glicosilación no parece ser el mecanismo responsable del incremento en el peso molecular del receptor, los ensayos de detección de glicoproteínas revelaron la presencia de proteínas glicosiladas con el mismo tamaño que el receptor de 80kDa en la membrana plasmática de las células SN56 y HT22. En este orden de ideas, se han descubierto recientemente en ratón varias poblaciones celulares del RE α modificadas por *O*-glicosilación, lo que parece estar relacionado con la regulación de la tasa de degradación del receptor, es decir, con la preservación estructural y funcional de la proteína (CHEN & HART [5]).

5. CONCLUSIONES

1) Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación demuestran la existencia de varias formas del RE (67 y 80 kDa) en la membrana plasmática de las líneas neuronales SN56 y HT22, las cuales son estructuralmente homólogas al RE α nuclear.

2) Además, se ha demostrado en estas mismas líneas celulares la existencia de proteínas glicosiladas con el mismo peso molecular que la forma de 80kDa del RE de tipo alfa presente en la membrana plasmática, lo que podría proporcionar un patrón de regulación similar al del RE nuclear en relación a la preservación estructural y funcional de la proteína.

3) Aunque es necesario profundizar en el estudio de las propiedades moleculares de estas formas alternativas del RE α , el alto grado de homología estructural, y probablemente de regulación de las formas nucleares y de membrana, sugieren que ambas proteínas pudieran tener un origen común.

6. AGRADECIMIENTOS

Financiado por los proyectos PI2003/154 (DGUI, Gobierno de Canarias), SAF2001-3614-C03-01 (MEC), SAF2004-08316-C02-01 (MEC), PI042460 (ISCI, FISS), y C03/06 (ISCI, FISS). Raquel Marín Cruzado es investigadora dentro del “Programa Ramón y Cajal” y Cristina M. Ramírez Hidalgo es becaria del subprograma de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] ASAITHAMBI, A., S. MUKERJEE & MK. THAKUR. 1997. Expression of 112kDa estrogen receptor in mouse brain cortex and its regulation with age. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **231**: 683-685.
- [2] BEATO, M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. **56**: 335-344.
- [3] BEYER, C., J. PAULAK & A. KAROLCZAK. 2003. Membrane receptors for oestrogen in the brain. *Journal of Neurochemistry*. **87**: 545-550.
- [4] CHANEY, L.K. & B.S. JACOBSON. 1983. Coating cells with colloidal silica for high yield isolation of plasma membrane sheets and identification of transmembrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*. **258**: 10062-10072.
- [5] CHEN, X. & G.W. HART. 2000. Glycosylation of the murine estrogen receptor alpha. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **75**: 147-158.
- [6] CLARKE, C.H., A.M. NORFLEET, M.S.F. CLARKE, C.S. WATSON, K.A. CUNNINGHAM & M.L. THOMAS. 2000. Perimembrane localization of the estrogen receptor α protein in neuronal processes of cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology*. **71**: 34-42.
- [7] DUBAL, D.B., P.J. SHUGHRUE, M.E. WILSON, I. MERCHENTHALER & P.M. WISE. 1999. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *Journal of Neuroscience*. **19**: 6385-6393.
- [8] GARCÍA-SEGURA, L.M., I. AZCOITIA & L.L. DON CARLOS. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*. **63**: 29-60.
- [9] JULENIUS, K., A. MØLGAARD, R. GUPTA & S. BRUNAK. 2005. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*. **15**: 153-164,
- [10] LEVIN, E.R. 2005. Integration of the extra-nuclear and nuclear actions of estrogen. *Molecular Endocrinology*. **19**(8): 1951-9
- [11] MARÍN, R., B. GUERRA, J.G. HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, X.L. KANG, J.D. FRASER, F.J. LÓPEZ & R. ALONSO. 2003a. Estradiol prevents amyloid- β peptide-induced cell death in a cholinergic cell-line via modulation of a classical estrogen receptor. *Neuroscience*. **121**: 917-926.
- [12] MARÍN, R., B. GUERRA, A. MORALES, M. DÍAZ & R. ALONSO. 2003b. An oestrogen membrane receptor participates in estradiol actions for the prevention of amyloid- β peptide₁₋₄₀-induced toxicity in septal-derived cholinergic SN56 cells. *Journal of Neurochemistry*. **85**: 1180-1189.

- [13] MARÍN, R., B. GUERRA, R. ALONSO, C.M. RAMÍREZ & M. DÍAZ. 2005. Estrogen activates classical and alternative mechanisms to orchestrate neuroprotection. *Current Neurovascular Research*. **2**: 287-301.
- [14] MARÍN, R., C.M. RAMÍREZ, M. GONZÁLEZ, R. ALONSO & M. DÍAZ. 2006. Alternative estrogen receptors homologous to classical receptor alpha in murine neural tissues. *Neuroscience letters*. **395**: 7-11.
- [15] MARINO, M., P. ASCENZI & F. ACCONCIA. 2006. S-Palmitoylation modulates receptor alpha localization and functions. *Steroids*. **71** (4): 298-303.
- [16] McCANN, J.P., J.S. MAYES, G.R. HENDRICKS, J.B. HARJO & G.H. WATSON. Subcellular distribution and glycosylation pattern of Androgen receptor from sheep omental adipose tissue. 2001. *Journal of Endocrinology*. **169**: 587-593.
- [17] McEWEN, B.S. 2001. Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of Applied Physiology*. **91**: 2785-2801.
- [18] NADAL, A., M. DÍAZ, & M.A. VALVERDE. 2001. The estrogen trinity: membrane, cytosolic and nuclear effects. *News in Physiological Sciences*. **16**:251-255.
- [19] NORFLEET, A.M., M.L. THOMAS, B. GAMETCHU & C.S. WATSON. 1999. Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology*. **140**: 3805-3814.
- [20] PAPPAS, T.C., B. GAMETCHU & C.S. WATSON. 1995. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB Journal*. **9**: 404-410.
- [21] PIKE, C.J. 1999. Estrogen modulates neuronal Bcl-XL expression and β amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. **72**: 1552-1563.
- [22] PINK, J.J., S.Q. WU, D.M. WOLF, M.M. BILIMORIA & V.C. JORDAN. 1996. A novel 80 kDa human estrogen receptor containing a duplication of exons 6 and 7. *Nucleic Acids Research*. **24**: 962-969.
- [23] SINGER, C.A., K.L. ROGERS & D.M. DORSA. 1998. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *NeuroReport*. **9**:2565-2568.
- [24] WATSON, C.S. & B. GAMETCHU. 1999. Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **220**: 9-19.
- [25] WATSON, C.S., C.H. CAMPBELL & B. GAMETCHU. 2002. The dynamic and elusive membrane estrogen receptor-alpha. *Steroids*. **67**: 429-437.
- [26] WEAVER, C.E., M. PARK-CHUNG, T.T. GIBBS & D.H. FARB. 1997. Estradiol protects against NDMA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NDMA receptors. *Brain Research*. **761**: 338-341.
- [27] ZHENG, J. & V.D. RAMÍREZ. 1997. Demonstration of membrane estrogen binding proteins in rat brain by ligand blotting using a 17 estradiol-(I125) bovine serum albumin conjugate. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **62**: 327-336.

